

基于 LC-MS 及网络药理学鉴定益景汤治疗糖尿病视网膜病变的活性成分及可能机制

罗丽梅¹, 黄婷², 程艳芳¹, 马煜贺¹, 谢琳¹, 何建忠³, 刘光辉³, 郑永征³

引用: 罗丽梅, 黄婷, 程艳芳, 等. 基于 LC-MS 及网络药理学鉴定益景汤治疗糖尿病视网膜病变的活性成分及可能机制. 国际眼科杂志, 2025, 25(8): 1219-1226.

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No.81774369); 福建省自然科学基金项目 (No.2022J01352)

作者单位: ¹(350004) 中国福建省福州市, 福建中医药大学第一临床医学院; ²(200032) 中国上海市, 上海中医药大学附属龙华医院眼科; ³(350004) 中国福建省福州市, 福建中医药大学附属人民医院 福建中医药大学中西医结合眼科研究所

作者简介: 罗丽梅, 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 视网膜、脉络膜、玻璃体相关疾病。

通讯作者: 郑永征, 女, 硕士, 主任医师, 研究方向: 视网膜、脉络膜、玻璃体相关疾病. dandelion_zyz@163.com

收稿日期: 2024-12-28 修回日期: 2025-06-27

摘要

目的: 基于液相色谱-质谱联用 (LC-MS) 及网络药理学探讨益景汤治疗早期糖尿病视网膜病变的主要活性成分和潜在机制。

方法: 采用 LC-MS 技术对益景汤的活性成分进行定性。根据 ADME 属性明确益景汤中的主要活性成分, 结合网络药理学的方法, 得到益景汤潜在治疗糖尿病视网膜病变的靶点, 进一步通过疾病蛋白靶点之间蛋白质相互作用 (PPI)、基因本体论 (GO) 富集分析和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 信号通路分析, 预测益景汤治疗糖尿病视网膜病变的核心靶点与网络。最后, 对核心靶标及通路进行 Western blot 实验验证。

结果: 益景汤中的主要活性成分与疾病靶点互作的核心靶点有 TNF、Alb、EGFR、STAT3、PTGS2、ESR1、PPAR、MMP9、TLR4、MAPK 等; 益景汤治疗糖尿病视网膜病变主要与癌症信号通路、流体剪切应力与动脉粥样硬化、神经退行性变的途径等相关, 并集中于炎症反映的调节、程序性细胞死亡的正调控、细胞迁移的正向调节等生物过程。Western blot 实验结果显示益景汤可抑制体外高糖环境下大鼠视网膜微血管内皮细胞 P-STAT3/STAT3、P-ERK/ERK 的表达水平, 即抑制 STAT3、ERK 磷酸化。

结论: 本研究揭示了益景汤的药效学物质基础及其潜在的多组分、多靶点、多途径的药理作用, 益景汤可能通过调节多信号通路, 抑制眼底炎症反应, 从而保护视网膜血管内皮细胞、维护血-视网膜屏障、促进视网膜神经血管损伤的修复, 进而发挥治疗糖尿病视网膜病变的作用。

关键词: 益景汤; 糖尿病视网膜病变; 液相色谱-质谱联用 (LC-MS); 网络药理学

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2025.8.02

Identification of active ingredients and possible mechanisms of Yijing Decoction in treating diabetic retinopathy based on liquid chromatography-mass spectrometry and network pharmacology

Luo Limei¹, Huang Ting², Cheng Yanfang¹, Ma Yuhe¹, Xie Lin¹, He Jianzhong³, Liu Guanghui³, Zheng Yongzheng³

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (No.81774369); Natural Science Foundation of Fujian Province (No.2022J01352)

¹First Clinical Medical College, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350004, Fujian Province, China;

²Department of Ophthalmology, Longhua Hospital Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China; ³Affiliated People's Hospital of Fujian University of Traditional Chinese Medicine; Eye Institute of Integrated Chinese and Western Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350004, Fujian Province, China

Correspondence to: Zheng Yongzheng. Affiliated People's Hospital of Fujian University of Traditional Chinese Medicine; Eye Institute of Integrated Chinese and Western Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350004, Fujian Province, China. dandelion_zyz@163.com

Received: 2024-12-28 Accepted: 2025-06-27

Abstract

• **AIM:** To identify the primary active components and underlying mechanisms of Yijing Decoction (YJD) in treating early diabetic retinopathy (DR) based on liquid chromatography - mass spectrometry and network pharmacology.

• **METHODS:** Active components of YJD were characterized through LC-MS. Components with optimal ADME (absorption, distribution, metabolism, excretion) properties were selected as key bioactive candidates. Network pharmacology approaches were employed to predict YJD - DR therapeutic targets. Protein - protein interaction (PPI) networks, gene ontology (GO) enrichment analysis, and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway analysis were subsequently conducted to predict core targets and networks. Critical targets and pathways were experimentally validated through Western blot.

• **RESULTS:** Ten core therapeutic targets were identified, including TNF, Alb, EGFR, STAT3, PTGS2, ESR1, PPAR, MMP9, TLR4, and MAPK. YJD was related to cancer-related signaling, fluid shear stress and atherosclerosis, and neurodegenerative diseases, encompassing key biological processes such as inflammatory response regulation, programmed cell death activation, and enhanced cell migration. Furthermore, Western blot analysis confirmed that YJD significantly inhibited high glucose-induced phosphorylation of STAT3 (P-STAT3/STAT3) and ERK (P-ERK/ERK) in rat retinal microvascular endothelial cells.

• **CONCLUSION:** This study revealed YJD's pharmacodynamical basis and its multi-component, multi-target, and multi-paths pharmacology. YJD exerts therapeutic effects on DR by coordinately regulating critical signaling pathways and alleviating intraocular inflammation, thus preserving retinal vascular endothelial cells, maintaining blood-retinal barrier integrity, and facilitating retinal neurovascular repair.

• **KEYWORDS:** Yijing Decoction; diabetic retinopathy; liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS); network pharmacology

Citation: Luo LM, Huang T, Cheng YF, et al. Identification of active ingredients and possible mechanisms of Yijing Decoction in treating diabetic retinopathy based on liquid chromatography-mass spectrometry and network pharmacology. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)*, 2025, 25(8):1219-1226.

0 引言

糖尿病视网膜病变 (diabetic retinopathy, DR) 是糖尿病 (diabetic mellitus, DM) 最具破坏性的并发症之一, 是全球致盲的主要原因^[1]。全世界范围内, DM 患者的 DR 发病率约占 22.27%^[2]; 在中国, DR 和视力威胁型 DR 的患病率分别为 16.3% 和 3.2%^[3]。DR 起病隐匿, 早期往往不容易被发现, 一旦发展到晚期阶段, 患者则已经出现不可逆的视力下降, 因此早期筛查与及时治疗可有效降低 DR 的致盲率。然而, 除了严格控制血糖外, 早期 DR 其他干预手段疗效证据质量存在不确定性^[4]。因此, 深入研究 DR 发病的分子机制和开发疗效与安全性兼并的新型治疗药物具有重要意义。中药复方调治 DR 的优势不可小觑。多项研究证明, 中医药疗法靶点多位、层次丰富, 对 DR 有较好的干预效果^[5], 尤其在改善理化指标和稳固疗效方面具有极大潜力。破译中药治疗疾病的机制与安全性是长期课题, 需要借助新的思路与科学的方法来揭示中药与疾病之间的复杂相互作用。网络药理学 (network pharmacology, NP) 是大数据时代的新兴学科, 融合了医学生物学、计算机科学、生物信息学等多学科的基础理论与研究方法, 从整体角度解析药物对疾病网络的系统性药理机制^[6], 这与中医基本的整体观念和中药复方多成分、多靶点、多途径交互作用的特点有异曲同工之妙, 为可视化中药治疗多因素疾病的潜在交互网络与指导临床诊疗、新药研发提供强有力的技术支持^[7]。为此, 本研究借助液相色谱-质谱联用 (liquid chromatography-mass spectrometry,

LC-MS) 技术与 NP 研究方法, 鉴定益景汤的功能活性成分, 明晰益景汤调治 DR 的有效机制, 同时为后续的研究提供参考依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞培养与分组 实验用大鼠视网膜微血管内皮细胞 (rat retinal microvascular endothelial cells, rRMECs) 株, 购自武汉普诺赛生命科技有限公司 (CP-R114)。rRMECs 接种于 10% 胎牛血清、1% 青-链霉素、1% 内皮细胞生长补充剂的 ECM 培养基中, 放入 37 ℃、5% CO₂ 孵箱培养。当细胞密度超过 80% 时, 按 1:2 比例传代, 取 2-3 代细胞进行实验。将 rRMECs 随机分为三组: 对照组 (CG 组, 5.5 mmol/L 葡萄糖 ECM 培养基)、高糖组 (HG 组, 33 mmol/L 葡萄糖 ECM 培养基)、益景汤组 (YG 组, 33 mmol/L 葡萄糖 + 4 mg/mL 益景汤 ECM 培养基)。待传代细胞融合至 80%-90% 时, 按分组加入相应培养基条件培养 24 h。

1.1.2 材料与试剂 高效液相级乙腈购自德国默克公司, 甲酸、纯水购自德国杜塞尔多夫公司, 所有化学品和溶剂均为分析试剂或色谱级。GAPDH 抗体 (货号 60004-1-Ig, 武汉三鹰生物技术有限公司), STAT3 抗体 (货号 10253-2-AP, 武汉三鹰生物技术有限公司), P-STAT3 抗体 (货号 AF3293), ERK 抗体 (货号 11257-1-AP, 武汉三鹰生物技术有限公司), P-ERK 抗体 (货号 AF1015, 美国 Affinity 公司)。益景汤 (生黄芪 15 g、山药 15 g、苍术 9 g、桃仁 5 g、红花 5 g、当归 9 g、川芎 6 g、赤芍 10 g、茯苓 15 g、生地 15 g、玄参 15 g), 购自康美药业 (中国广州市), 质量符合 2020 年版《中国药典》标准。每剂由福建中医药大学附属人民医院药剂科浓煎至 50 mL 备用。

1.1.3 仪器与设备 超高压液相色谱仪 (货号 UltiMate 3000, 美国赛默飞世尔科技公司); 高分辨质谱仪 (QTOF 5600, 美国 ABSCIEX 公司); T3 色谱柱 (1.8 μm, 2.1 mm×100 mm, 美国 Waters 公司); 蛋白垂直电泳仪 (货号 POWER PAC 200, 美国 BIO-RAD 公司); 显影仪 (货号 TOUCH IMAGER xli, 杭州易博特科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 LC-MS 检测益景汤主要活性

1.2.1.1 中药复方汤剂处理 取益景汤 500 μL, 于 13 000 r/min 转速下离心 10 min 取上清上机检测。

1.2.1.2 LC-MS 条件 (1) 色谱柱为 C18 (1.9 μm, 2.1 mm×100 mm), 柱温: 45 ℃, 分析使用流速 0.3 mL/min, 流动相采用 0.1% 甲酸/乙腈 (B)-0.1% 甲酸/水 (A)。溶液的梯度洗脱程序见表 1。(2) 质谱学条件如下: 选用电子喷雾电离 (electron spray ionization, ESI) 源, 离子源温度 310 ℃, 毛细管温度 320 ℃, 鞘气流速 30 单位, 辅助气流速 10 单位, 正离子模式喷雾电压 3 kV, 负离子模式喷雾电压 2.8 kV。(3) 分析: 采用数据依赖扫描分析 (DDA), loop count 设定值为 10, HCD 能量采用 step-wise 归一化碰撞能, 设定值 10、28、35 eV。一级质谱扫描范围 80-1 200 m/z, 分辨率设为 70 000, AGC target 设定为 3E6, 注入时间设置为 200 ms。二级质谱分辨率设为 17 500, AGC target 设定为 1E5, 注入时间设置为 50 ms。

表 1 流动相梯度洗脱程序 %

时间(min)	A(0.1% 甲酸/水)	B(0.1% 甲酸/乙腈)
0	90	10
10	0	100
15	0	100
17.1	90	10
20	90	10

1.2.1.3 多变量数据分析 经过代谢组学处理软件 Compound discover V 3.2 (hermo fisher scientific, CA, USA) 自动搜索数据库 (包含 chemspider 植物数据库 CHEBI, ChEMBL, 天然产物数据库, 黄酮数据库, OTC 中药数据库以及 mzCloud 数据库等), 分析可能存在的化学成分。

1.2.2 益景汤主要活性成分相关靶点筛选 将分析出来的化学成分名称载入 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>), 获得化合物的 SMILES 号及 2D 分子图, 将 2D 分子图载入 SwissTargetPrediction 数据库, 根据 GI absorption 为“High”且 Druglikeness 至少 2 项为“yes”的 ADME 属性值进行主要活性成分筛选, 获得活性化合物^[8]及其作用的蛋白质靶点^[9]。筛选结束后, 统一在 Uniprot 蛋白质数据库 (<https://www.uniprot.org>) 将化合物作用的蛋白质靶点进行规范。

1.2.3 DR 相关靶点筛选 以“Diabetic Retinopathy”为关键词, 挖掘 GeneCards 数据库 (<https://www.genecards.org>)、OMIM 数据库 (<http://www.omim.org>)、DisGeNET 数据库 (<https://disgenet.com/>) 中治疗 DR 的潜在靶点, 合并 3 个疾病数据库靶点后, 删除重复值得到 DR 的靶点。

1.2.4 益景汤主要活性成分——DR 靶点 PPI 网络构建 为明确益景汤主要活性成分的治疗靶点是否与 DR 相关, 将活性成分靶点和疾病靶点取交集以获得共同的靶点, 这些交集基因即认为是益景汤治疗 DR 的潜在靶点。为分析潜在靶点之间功能和调节的相互作用, 将交集基因提交至 STRING12.0 数据库 (<https://string-db.org>)^[10] 构建蛋白质相互作用 (PPI) 网络模型, 设置生物种类为“Homo sapiens”, 设定最低互相作用阈值为“highest confidence”(>0.9)。通过 Cytoscape3.7.2 软件^[11]中的 MCODE 插件对 PPI 网络进行可视化, 得到主要活性成分——核心靶点网络, 分析益景汤治疗 DR 的潜在生物学进程。

1.2.5 益景汤主要成分——DR 靶点功能与通路的富集分析 将益景汤调治 DR 的靶点录入 Metascape 平台 (<https://metascape.org/>)^[12], 进行京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 信号通路和基因本体论 (GO) 富集分析, 以探讨益景汤治疗 DR 的关键信号通路与生物学过程。

1.2.6 Western blot 实验验证 用 Western blot 法检测三组 STAT3、p-STAT3、ERK、p-ERK 的表达水平。将培养皿中的 rMECs 用预冷 PBS 清洗 3 次, 加入 RIPA 裂解缓冲液置于冰上裂解细胞 30 min。离心裂解产物后取上清液移至新管, 通过 BCA 试剂盒定量蛋白浓度。用含有十二烷基硫酸钠 (sodium dodecyl sulfate, SDS) 的上样缓冲液变性蛋白样品, 然后将等量的样品用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法分离, 再转移至聚偏氟乙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜上。膜经室温下 5% 脱脂奶粉封闭 1 h、4℃ 下一抗 (1:2000 稀释) 经孵育过夜、室温下二抗 (1:10000 稀释) 孵育 1 h 后, 膜通过使用 ECL 试剂盒处理后, 暴露于

ChemiDoc XRS 系统 (Bio-Rad) 以观察蛋白条带, 并用 Image Lab 软件 (Bio-Rad) 定量, 以 GAPDH 为内参测定表达水平。

统计学分析: 采用 Graph 8.0.2 软件进行统计分析, 符合正态分布且方差齐的计量资料以均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用单因素方差分析 (ANOVA) 进行多组变量间的相互比较, 两两比较采用 LSD-*t* 检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 LC-MS 检测与益景汤主要活性成分的分析结果

2.1.1 基峰色谱图 基峰色谱图 (base peak chromatogram, BPC) 是根据每个时间点最强的离子强度连续描绘得到的图谱, 主要给出目标物的分子量, 见图 1、2。

2.1.2 益景汤主要活性成分获取 提取上述 LC-MS 研究的定性分析数据, 共得到 109 个活性成分, 经 SwissADME 筛选后, 得到 46 个主要活性成分, 包括: L-亮氨酸、DL-苹果酸、L-苯丙氨酸、4-氧脯氨酸、L-脯氨酸、5-羟甲基糠醛、4-甲氧基水杨酸氨基丁酸、L-色氨酸、D-天冬酰胺、DL-扁桃酸甲酯、L-酪氨酸、没食子酸、毛蕊异黄酮、L-苏氨酸、刺芒柄花素、L-蔗糖酸、壬二酸、对苯二甲酸等, 利用 CytoScape 3.7.2 软件绘制出益景汤中主要活性成分网络 (图 3)。

2.2 益景汤主要活性与 DR 交集靶点的获取 上述 46 个主要活性成分通过 SwissTargetPrediction 共预测得到 440 个靶点; GeneCards、OMIM 与 DisGeNET 数据库结果合并后共得到 DR 的疾病靶点 1 795 个。运用 Venny2.1.0 在线绘图软件获取益景汤主要活性成分与 DR 的交集靶点, 并绘制韦恩图 (图 4), 可知益景汤主要活性成分与 DR 共有 219 个交集靶点。

2.3 益景汤治疗 DR 核心靶点的 PPI 网络构建 将 STRING 数据库中获得的 PPI 结果导入 Cytoscape 3.7.2 软件, 绘制益景汤治疗 DR 核心靶点 PPI 网络图 (图 5), 图中靶点度值越大, 橙色越深; 蛋白间的功能关联越紧密, 连线越粗、橙色越深。由图 5 可知, 益景汤治疗 DR 的核心靶点有: 信号传导转录激活因子 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)、肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF)、白蛋白 (albumin, Alb)、表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR)、前列腺素内过氧化物合酶 (prostaglandin endoperoxide synthase 2, PTGS2)、雌激素受体 1 (estrogen receptor, ESR1)、过氧化物酶体增殖物激活受体 (peroxisome proliferative activated receptor, PPAR)、基质金属蛋白酶 9 (matrix metalloprotein 9, MMP9)、Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4)、丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 等, 说明这些靶点基因可能也在 PPI 网络中发挥着关键的调控作用。

2.4 益景汤治疗 DR 靶点的 KEGG 富集分析 相关靶点调节 DR 的 KEGG 富集分析结果表明, 益景汤治疗 DR 主要涉及的通路有: 癌症信号通路 (pathways in cancer)、流体剪切应力 (fluid shear stress, FSS) 与动脉粥样硬化 (atherosclerosis)、神经退行性变的途径 (pathways of neurodegeneration)、5-羟色胺能突触 (serotonergic synapse)、钙离子信号通路 (calcium signaling pathway) 等, 见图 6。

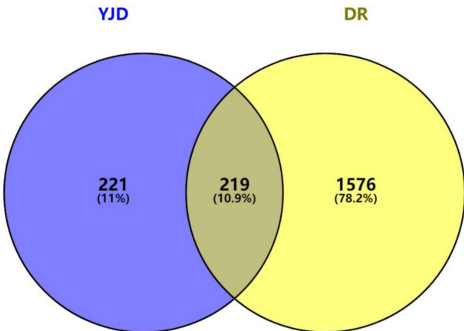


图4 益景汤主要活性与DR交集靶点的韦恩图。

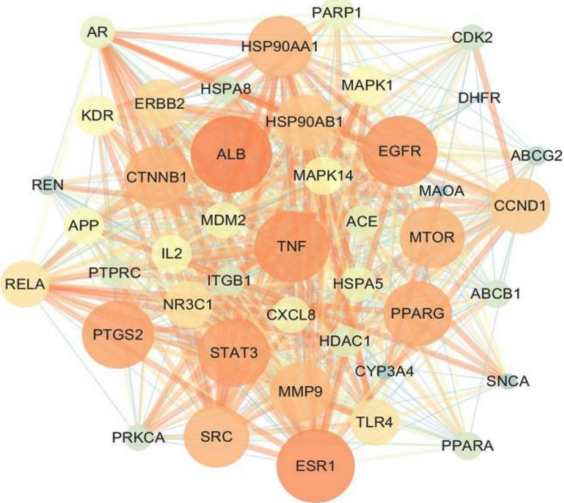


图5 益景汤治疗DR核心靶点的PPI网络。

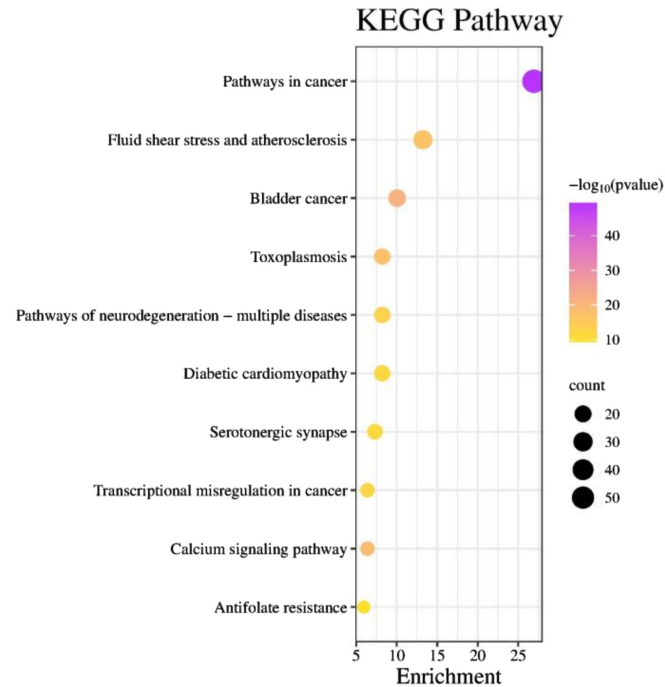


图6 益景汤治疗DR靶点KEGG通路富集分析。

2.5 益景汤治疗DR靶点的GO富集分析 相关靶点调节DR的GO富集分析结果表明,益景汤治疗DR的生物学过程(biological processes, BP)主要涉及对炎症反应的调节(regulation of inflammatory response)、程序性细胞死亡的正调控(positive regulation of programmed cell death)、细胞迁移的正向调节(positive regulation of cell migration)等;益景

汤调控DR的细胞学组分(cellular components, CC) 主要用于受体复合体(receptor complex)、细胞质核周区(perinuclear region of cytoplasm)、膜筏(membrane raft)、神经元细胞体(neuronal cell body)等;益景汤作用于DR分子生物学功能(molecular functions, MF) 主要是调节氧化还原酶活性(oxidoreductase activity)、蛋白酪氨酸激酶活性(protein tyrosine kinase activity) 及与各种激酶集合等,见图7。

2.6 益景汤可抑制高糖条件下rRMECs的P-STAT3/STAT3及P-ERK/ERK表达量 根据KEGG通路富集结果预测,益景汤调治DR最主要是通过肿瘤信号通路。肿瘤信号通路主要包括核因子κB(nuclear factor kappa-B, NF-κB)、磷脂酰肌醇3-激酶(phosphatidylinositide 3-kinases, PI3K)/丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶(AKT)、MAPK、酪氨酸蛋白激酶(janus kinase, JAK)-STAT、转化生长因子-β(transforming growth factor-β, TGF-β)等。既往研究中,我们已经验证益景汤可从PI3K/AKT信号通路^[13]抑制体外高糖环境对rRMECs造成的损伤,及通过TGF-β信号通路^[14]提高内皮细胞活性与细胞间紧密连接的表达,改善高糖作用下的微血管损伤。根据PPI结果,STAT3、MAPK不仅是益景汤调治DR的核心靶点,JAK/STAT、MAPK/ERK信号通路对DR的进展也有重要意义。因此,本次研究采用Western blot法对核心靶点STAT3与MAPK下游ERK进行验证。结果如图8所示,CG组大鼠视网膜微血管内皮细胞P-STAT3/STAT3、P-ERK/ERK表达量分别为0.19±0.03、0.40±0.07,经HG处理后,rRMECs的P-STAT3/STAT3、P-ERK/ERK表达量显著升高至0.62±0.08、0.77±0.11(均P<0.05);与HG组相比,YG组细胞P-STAT3/STAT3、P-ERK/ERK表达量下降至0.39±0.04、0.57±0.04,差异具有统计学意义(均P<0.05)。

3 讨论

益景汤为福建省名中医金威尔教授治疗早期DR的经验方,具有益气养阴、活血通络之功。前期多项临床研究已证实其对气阴两虚型DR患者的有效性^[15-16],基础研究亦表明其可减轻DR大鼠模型中血-视网膜屏障(iBRB)受损^[17]。本研究在前期工作的基础上,采用LC-MS、网络药理学和Western blot相结合的方法,进一步对益景汤治疗DR的有效成分与作用机制进行了系统探讨,为揭示其药效学提供研究依据。

PPI分析发现,益景汤用于DR治疗的靶点主要与TNF、EGFR、STAT3、MMP9、MAPK相关。临床研究证实,TNF在DR中的促炎作用显著,是干预炎症反应的重要靶点^[18];MMP9参与视网膜微血管基底膜降解,并触发视网膜细胞凋亡^[19-20],抑制MMP9表达可保护视网膜微血管结构^[21];EGFR、STAT3、MAPK家族(尤其是ERK)在DR中共同参与炎症反应、细胞增殖、凋亡与血管新生等病理过程^[22-23],成为糖尿病并发症研究的关键焦点^[13,24-25],研究表明抑制ERK活化已显示出减缓血管疾病进展的潜力^[14]。本次PPI结果表明,益景汤活性成分主要为TNF、EGFR、STAT3、MMP9、MAPK等相互作用,表明益景汤通

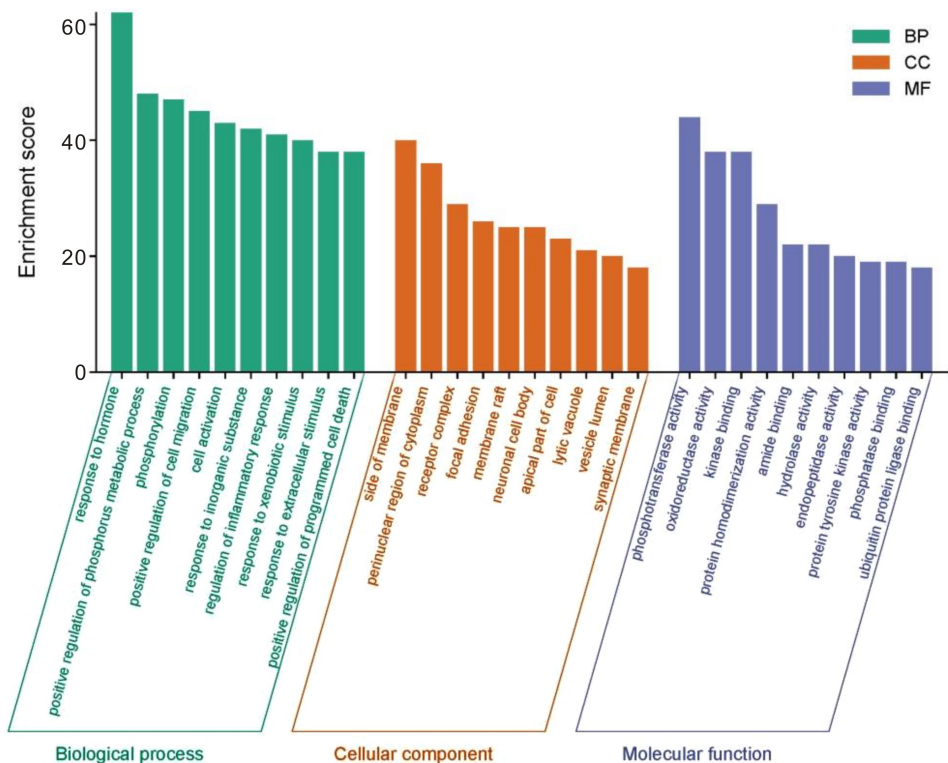


图7 益景汤治疗DR靶点GO富集分析。

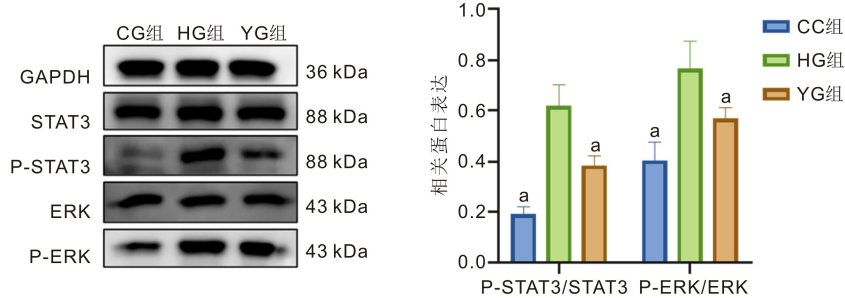


图8 益景汤对各组大鼠视网膜微血管内皮细胞相关蛋白表达的影响 GAPDH:磷酸甘油醛脱氢酶;STAT3:信号传导和转录激活因子3;ERK:细胞外信号调节激酶;P-STAT3:磷酸化信号传导和转录激活因子3;P-ERK:磷酸化细胞外信号调节激酶。 $P<0.05$ vs HG组。

过多靶点协同作用发挥治疗 DR 的潜力。研究进一步采用 Western blot 方法,验证益景汤对高糖条件下 rRMECs 关键靶点 STAT3、p-STAT3、ERK 和 p-ERK 表达水平的影响,观察到高糖环境可以促进 rRMECs 中 STAT3 和 ERK 的激活。经益景汤治疗后,p-STAT3 和 p-ERK 水平降低,表明益景汤可能通过抑制 MAPK、ERK 活化从而减轻 DR 的微血管损伤。

核心靶点的 KEGG 通路富集分析结果表明,益景汤可能通过癌症信号通路、FSS 与动脉粥样硬化通路、神经退行性疾病通路等多路径发挥作用。癌症信号通路通常是介导相关细胞增殖、分化、炎症和血管生成的过程^[26]。越来越多的研究表明,炎症反应是 DR 发病和进展的基础。微血管中白细胞淤滞的存在和多种信号通路的激活导致视网膜微血管内皮细胞受损和血-视网膜屏障的破坏^[27-28],进一步诱导新生血管的形成。因此,抑制早期 DR 的炎症反应可以延缓病情进展。FSS 和动脉粥样硬化信号通路中,FSS 主要影响血流切线方向的内皮细胞功

能,从而对维持视网膜血管稳态做出重大贡献^[29]。生理性 FSS 可以增强内皮细胞的抗炎、抗凋亡和抗血栓形成能力^[28]。血流紊乱下的 FSS 很容易刺激内皮细胞,引起炎症反应和氧化应激^[30-31]。FSS 的大小受血流动力学和血管形态等因素的调节^[32]。糖尿病可引起视网膜血管形态的变化,改变视网膜血流动力学和生物力学参数。因此,DR 患者的视网膜血管更容易发生壁破裂和损伤^[33]。早期研究^[34-35]表明,益景汤可以提高 DR 大鼠的血流速度,降低血液黏度,从而增加视网膜血供。然而,目前还缺乏对特定参数的研究,FSS 信号通路为未来的研究提供了指导。

本研究中,KEGG 通路分析揭示益景汤治疗 DR 还与神经退行性病变相关通路密切相关。近年来,DR 逐渐被定义为一种神经-微血管耦合障碍性疾病^[36-37]。研究证实,神经病变常发生在眼底微血管结构明显损伤之前,提示神经损伤可能是 DR 的早期事件^[38-39],并通过炎症因子释放、血-视网膜屏障破坏等途径,进一步加重微血管病

变^[40]。伦英俊等^[41]研究发现,调节视网膜神经系统功能,可抑制 ERK 磷酸化水平,延缓 DR 的发生发展。本次研究中,验证了益景汤可下调 ERK 表达,可能在减轻微血管内皮细胞损伤的同时,对视网膜神经系统产生保护作用,延缓神经退行性改变^[42],体现其多通路、多靶点协同调节视网膜神经-血管单元的优势。这一机制为益景汤在 DR 早期综合防治中的应用提供了实验室基础。

综上所述,本研究发现益景汤治疗 DR 的主要活性成分是其通过调节多种信号通路抑制眼底炎症的能力。这有助于保护内皮细胞,维持血-视网膜屏障,修复视网膜神经血管损伤。此外,益景汤还通过改善血流动力学来增强视网膜血供。多年来本团队的研究也验证了这些预测作用机制,提示益景汤可作为防治早期 DR 的有效疗法。本次研究尚有不足:(1)利用 LC-MS 技术初步检测了益景汤的主要活性成分,但未归纳出关键作用的活性成分,可待团队内 LC-MS 技术习得更加成熟后,再进行关键成分定性与采用分子对接技术验证其与靶点作用的紧密度,使得益景汤防治 DR 的机制更加明了;(2)尽管多年来关于益景汤调治 DR 的研究涉及多条机制,但仍停留于较浅的研究层面(如已经研究了血流动力学途径,但对途径中的相关指标研究较少),然而,明晰益景汤作用于 DR 的具体机制也是本团队一直研究的方向,希望在未来可为益景汤治疗 DR 的疗效提供更加丰富的证据。

利益冲突声明:本文不存在利益冲突。

作者贡献声明:罗丽梅初稿撰写及修改;黄婷数据分析;程艳芳细胞培养;马煜贺、谢琳数据筛选;何建忠技术指导;经费支持;刘光辉液相色谱-质谱技术指导;郑永征选题指导,论文修改及审阅。所有作者阅读并同意最终的文本。

参考文献

[1] Li QB, Wang MQ, Li XR, et al. Aging and diabetic retinopathy: Inherently intertwined pathophysiological processes. *Exp Gerontol*, 2023, 175:112138.

[2] Teo ZL, Tham YC, Yu M, et al. Global prevalence of diabetic retinopathy and projection of burden through 2045: systematic review and meta-analysis. *Ophthalmology*, 2021, 128(11):1580-1591.

[3] Hou XH, Wang LM, Zhu DL, et al. Prevalence of diabetic retinopathy and vision-threatening diabetic retinopathy in adults with diabetes in China. *Nat Commun*, 2023, 14(1):4296.

[4] 中国医师协会中西医结合医师分会内分泌和代谢病学专业委员会. 糖尿病视网膜病变中西医结合诊疗指南(2021-09-24). *世界中医药*, 2021, 16(22):3270-3277.

[5] Ai XP, Yu PL, Hou Y, et al. A review of traditional Chinese medicine on treatment of diabetic retinopathy and involved mechanisms. *Biomed Pharmacother*, 2020, 132:110852.

[6] 世界中医药学会联合会. 网络药理学评价方法指南. *世界中医药*, 2021, 16(4):527-532.

[7] Li X, Liu ZQ, Liao J, et al. Network pharmacology approaches for research of traditional Chinese medicines. *Chin J Nat Med*, 2023, 21(5):323-332.

[8] Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissADME: a free web tool to

evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Sci Rep*, 2017, 7:42717.

[9] Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissTargetPrediction: updated data and new features for efficient prediction of protein targets of small molecules. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(W1):W357-W364.

[10] Szklarczyk D, Kirsch R, Koutrouli M, et al. The STRING database in 2023: protein-protein association networks and functional enrichment analyses for any sequenced genome of interest. *Nucleic Acids Res*, 2023, 51(D1):D638-D646.

[11] Shannon P, Markiel A, Ozier O, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res*, 2003, 13(11):2498-2504.

[12] Zhou YY, Zhou B, Pache L, et al. Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets. *Nat Commun*, 2019, 10(1):1523.

[13] 柯小清, 林颖, 任秉仪, 等. 益景汤联合康柏西普治疗气阴两虚夹瘀型非增殖性糖尿病性黄斑水肿 30 例. *福建中医药*, 2022, 53(8):9-11.

[14] 陈诗萍. 577nm 微脉冲激光联合益景汤加减治疗气阴两虚夹瘀型糖尿病黄斑水肿的疗效观察. 福建中医药大学, 2022.

[15] 刘光辉, 张云辉, 郑永征, 等. 益景汤对糖尿病大鼠血-视网膜屏障的影响. *中国中医眼科杂志*, 2021, 31(12):851-855.

[16] 任钰妍, 孙金宁, 刘素珍, 等. 中药抗糖尿病视网膜病变及其分子作用机制研究现状. *中国临床药理学杂志*, 2024, 40(22):3353-3357.

[17] Solanki A, Bhatt LK, Johnston TP, et al. Targeting matrix metalloproteinases for diabetic retinopathy: the way ahead? *Curr Protein Pept Sci*, 2019, 20(4):324-333.

[18] Velasquez M, O'Sullivan C, Brockett R, et al. Characterization of active MMP9 in chronic inflammatory diseases using a novel anti-MMP9 antibody. *Antibodies (Basel)*, 2023, 12(1):9.

[19] 王玉雯, 李芙蓉, 袁容娣. Gpr124 对高糖环境下视网膜微血管内皮细胞增殖、迁移和血管形成的调控作用. *陆军军医大学学报*, 2024, 46(18):2101-2109.

[20] Zhong HB, Qian J, Xiao ZH, et al. microRNA-133b inhibition restores EGFR expression and accelerates diabetes-impaired wound healing. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021:9306760.

[21] Sabbah DA, Hajjo R, Sweidan K. Review on epidermal growth factor receptor (EGFR) structure, signaling pathways, interactions, and recent updates of EGFR inhibitors. *Curr Top Med Chem*, 2020, 20(10):815-834.

[22] Cheng LM, Wang SQ, Peng C, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells for psoriasis: a phase 1/2a, single-arm study. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7(1):263.

[23] Guo Y, Guo CJ, Ha WJ, et al. Carnosine improves diabetic retinopathy via the MAPK/ERK pathway. *Exp Ther Med*, 2019, 17(4):2641-2647.

[24] Chen Y, Chen YH, Tang CH, et al. RPS4Y1 promotes high glucose-induced endothelial cell apoptosis and inflammation by activation of the p38 MAPK signaling. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 2021, 14:4523-4534.

[25] Long L, Li Y, Yu S, et al. Scutellarin prevents angiogenesis in diabetic retinopathy by downregulating VEGF/ERK/FAK/src pathway signaling. *J Diabetes Res*, 2019, 2019:4875421.

[26] You MS, Xie ZL, Zhang N, et al. Signaling pathways in cancer metabolism: mechanisms and therapeutic targets. *Signal Transduct Target*

Ther, 2023,8(1):196.

[27] Mrowicka M, Mrowicki J, Majsterek I. Relationship between biochemical pathways and non-coding RNAs involved in the progression of diabetic retinopathy. *J Clin Med*, 2024,13(1):292.

[28] Zhu XY, Hong JX, Zhou XJ. Biological immune mechanism of retina. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2023,28(12):363.

[29] Luo JY, Cheng CK, He L, et al. Endothelial UCP2 is a mechanosensitive suppressor of atherosclerosis. *Circ Res*, 2022,131(5):424-441.

[30] Yao XY, Zhao ZY, Zhang WH, et al. Specialized retinal endothelial cells modulate blood-retina barrier in diabetic retinopathy. *Diabetes*, 2024,73(2):225-236.

[31] Tamargo IA, Baek KI, Kim Y, et al. Flow-induced reprogramming of endothelial cells in atherosclerosis. *Nat Rev Cardiol*, 2023,20(11):738-753.

[32] Shih YT, Wei SY, Chen JH, et al. Vinculin phosphorylation impairs vascular endothelial junctions promoting atherosclerosis. *Eur Heart J*, 2023,44(4):304-318.

[33] Tripathy KC, Siddharth A, Bhandari A. Image-based insilico investigation of hemodynamics and biomechanics in healthy and diabetic human retinas. *Microvasc Res*, 2023,150:104594.

[34] 郑永征, 谢茂松, 刘光辉, 等. 加味补阳还五汤对糖尿病大鼠视网膜血管的影响. *福建医科大学学报*, 2013,47(1):34-38.

[35] 郑永征, 谢茂松, 刘光辉, 等. 加味补阳还五汤对糖尿病大鼠视网膜血流动力学的影响. *山西中医学院学报*, 2013,14(2):24-27.

[36] Zhou J, Chen B. Retinal cell damage in diabetic retinopathy. *Cells*, 2023,12(9):1342.

[37] Eggers ED. Visual dysfunction in diabetes. *Annu Rev Vis Sci*, 2023,9:91-109.

[38] Park YG, Lee JY, Kim C, et al. Early microglial changes associated with diabetic retinopathy in rats with streptozotocin-induced diabetes. *J Diabetes Res*, 2021,2021:4920937.

[39] Kinuthia UM, Wolf A, Langmann T. Microglia and Inflammatory Responses in Diabetic Retinopathy. *Front Immunol*, 2020,11:564077.

[40] Altmann C, Schmidt M. The Role of Microglia in Diabetic Retinopathy: Inflammation, Microvasculature Defects and Neurodegeneration. *Int J Mol Sci*, 2018,19(1):110

[41] 伦英俊, 陈晨, 高宏程, 等. TLR4/NF- κ B 通道在糖尿病视网膜病变中的作用. *山东大学耳鼻喉眼学报*, 2024,38(2):163-168.

[42] 王丽, 梁明丽, 孟春, 等. 益景汤对高糖环境中人脑微血管内皮细胞形态和 TGF- β 1/Smads 信号通路相关蛋白表达的影响. *福建中医药*, 2023,54(7):31-34.